



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Gestión de la Fermentación Maloláctica en vinos de Maturana Tinta

Autor/es

IRENE ITURBE FERNÁNDEZ

Director/es

ANA ROSA GUTIÉRREZ VIGUERA

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2019-20



Gestión de la Fermentación Maloláctica en vinos de Maturana Tinta, de IRENE ITURBE FERNÁNDEZ

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor, 2020

© Universidad de La Rioja, 2020

publicaciones.unirioja.es

E-mail: publicaciones@unirioja.es



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de Ciencia y Tecnología

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Enología

GESTIÓN DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN VINOS DE MATURANA TINTA

Realizado por:

Irene Iturbe Fernández

Tutelado por:

Ana Rosa Gutiérrez Viguera

Curso 2019-2020

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que me han prestado su ayuda y apoyo a lo largo de la realización de este trabajo.

En primer lugar, a la directora de este TFG Ana Rosa Gutiérrez Viguera, por animarme a la realización de este trabajo desde el primer momento, por su apoyo constante, su incalculable ayuda y sus consejos, así como a todo el grupo de investigación de Gestión y Control de las Vinificaciones en el ICVV y a esta entidad por su implicación y tiempo dedicado.

En segundo lugar, quería agradecer el apoyo recibido a todo el equipo de la Bodega Viña Ijalba cuya participación ha sido de vital importancia en la realización de este proyecto y en especial a su enólogo Pedro Salguero por sus enseñanzas a lo largo de todo este tiempo, por transmitirme su pasión y dedicación por esta profesión, su paciencia, su implicación en mi aprendizaje y su respaldo incondicional.

También quiero aprovechar para dar las gracias a la empresa Lallemand Inc. sin cuyo material la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A la Universidad de La Rioja por todos estos años y por los conocimientos brindados.

Por último, pero no menos importante, a mi familia, amigos y sobre todo a mi madre, por su paciencia, su apoyo y ayuda constante durante todos estos años.

RESUMEN

La Fermentación maloláctica es un proceso en el cual las bacterias lácticas metabolizan el ácido málico transformándolo en ácido láctico cuyas consecuencias en las características organolépticas de los vinos pueden ser tanto positivas como negativas. En este trabajo se estudia el desarrollo de este proceso en vinos de la variedad Maturana tinta inoculados con tres bacterias lácticas seleccionadas diferentes, dos de ellas aisladas dentro de la D.O.Ca. Rioja. También se estudió la influencia de la FML sobre un parámetro de gran importancia en la calidad de los vinos como es la acidez volátil. La elaboración se realizó en la bodega Viña Ijalba en la añada 2017. Se observó que los elevados niveles de acidez volátil no se producían durante la FML, sino durante el posterior almacenamiento de los vinos, sobre todo debido a las características del vino de partida y especialmente a su elevado pH.

ABSTRACT

Malolactic fermentation is a process where lactic acid bacteria metabolize malic acid into lactic acid. This process has consequences on the organoleptic characteristics of the wines, which can be both positive and negative. The aim of this paper is to know the development of this process in wines of the Maturana Tinta variety inoculated with three different selected lactic bacteria, two of them isolated within the D.O.Ca. Rioja. The influence of malolactic fermentation on volatile acidity was also studied. The vinification was carried out at the Viña Ijalba winery in the 2017 vintage. It was observed that the high levels of volatile acidity did not occur during the malolactic fermentation, but during the subsequent storage of the wines, mainly due to the high pH of the starting wine.

ÍNDICE

AGREDECIMIENTOS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La Fermentación Maloláctica	1
1.1.1. Antecedentes del conocimiento de la FML	1
1.1.2. Bacterias lácticas	2
1.1.3. Ecología y desarrollo de las BL en el vino	4
1.1.4. Mecanismo bioquímico de la FML	6
1.1.5. Metabolismo de las BL	7
1.2. Factores que influyen en la FML	10
1.2.1. Factores agronómicos	10
1.2.2. Factores tecnológicos	10
1.2.3. Factores físico-químicos	11
1.2.4. Factores microbiológicos	12
1.3. Influencia de la FML sobre la composición del vino	13
1.3.1. Efectos beneficiosos	13
1.3.2. Efectos perjudiciales	14
1.4. La variedad Maturana Tinta	15
2. OBJETIVO	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Cepas de bacterias empleadas	18
3.1.1. Uvaferm ALPHA ®	18
3.1.2. LALVIN SILKA	19
3.2. Ensayo	21
3.2.1. Experiencia	22
3.2.2. Análisis fisicoquímico de los vinos	23
3.2.3. Toma de muestras para los controles microbiológicos	25
3.2.5. Medios de cultivo y disoluciones	30
3.2.6. Análisis estadístico de los resultados	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. Evolución de la Fermentación Maloláctica	31

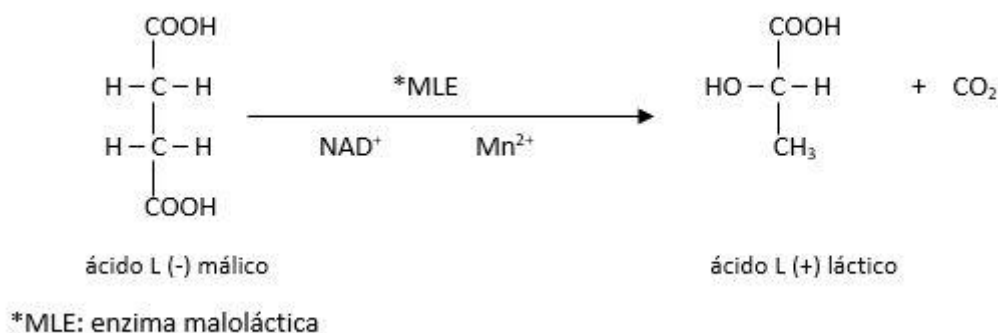
4.2. Control de Implantación	33
4.3. Efecto de la fermentación maloláctica en la composición físico-química de los vinos.....	34
4.4. Evolución de la acidez volátil	37
5. CONCLUSIONES	39
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Fermentación Maloláctica

La fermentación maloláctica (FML) se fundamenta en la desacidificación biológica del vino (Figura 1) resultante de la transformación de ácido L (-) málico (dicarboxílico) en ácido L (+) láctico (monocarboxílico) y CO₂ por la acción de las bacterias lácticas (BL). Como consecuencia tiene lugar una disminución de la acidez total, un incremento del pH y cambios en las características organolépticas del vino.

Figura 1. Metabolismo del ácido málico por las BL. Fuente: López, 2004.



El balance teórico de la FML (también llamada degradación maloláctica) sugiere que, por cada 100 g de ácido málico consumido, se producen 67,2 g de ácido láctico y 32,8 g de CO₂.

Esta segunda fermentación es opcional, a diferencia de la Fermentación Alcohólica (FOH) que es un proceso obligado para la obtención de vino, y puede impedirse añadiendo anhídrido sulfuroso en cantidad suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano, o bien se puede facilitar actuando en sentido contrario. Es un proceso esencial para el afinamiento y estabilidad de los vinos tintos constituyendo el primer paso hacia la fase de envejecimiento en zonas vitícolas como Rioja donde predomina la vinificación de los vinos tintos.

1.1.1. Antecedentes del conocimiento de la FML

En el siglo XIX se encuentran las primeras indicaciones de este proceso: en 1837 Freiherr Von Babo observó una segunda fermentación en vinos jóvenes a través de indicios como la liberación de CO₂ y la aparición de turbidez que coincidían con el incremento de temperaturas

al final de la primavera. En 1866 Louis Pasteur aisló las primeras bacterias de vino, que consideraba perjudiciales durante los estudios que llevó a cabo sobre las alteraciones de vino, sugiriendo que su aparición se presentaba como un accidente grave que se debía evitar. Relacionó la reducción de acidez con la precipitación del ácido tartárico.

La aceptación normal y general del fenómeno tuvo lugar a partir de 1936, con los trabajos de Ribéreau-Gayon (Burdeos) en los cuales se demostró la trascendencia de este proceso valorándolo como una etapa imprescindible en la vinificación de los vinos tintos. No fue hasta 1980 cuando se comercializaron las primeras cepas de bacterias enológicas para la industria vitivinícola.

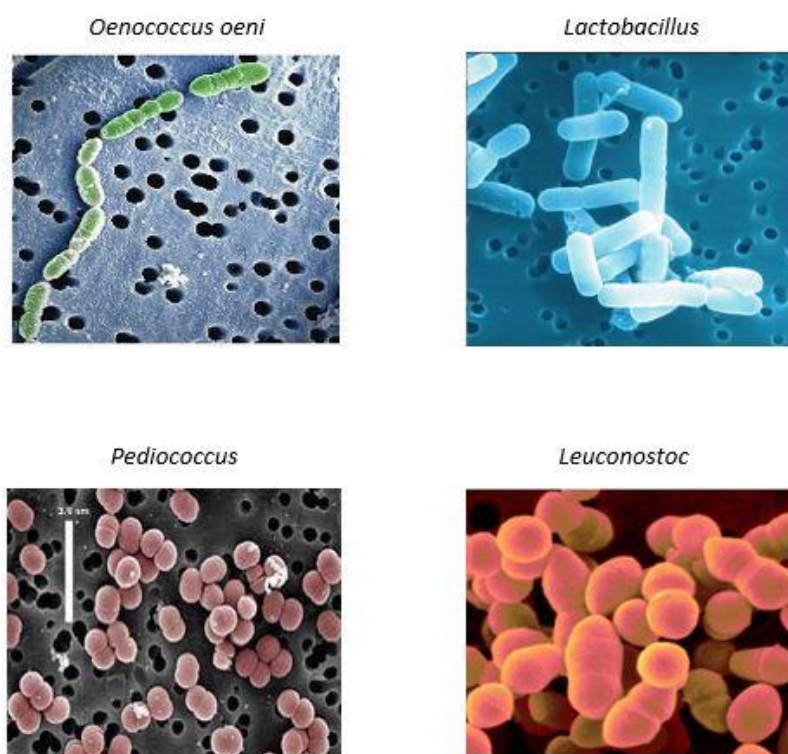
Actualmente, es considerado como un fenómeno de gran importancia práctica que se realiza de forma relativamente simple, además de un importante factor de calidad incluso en años de gran madurez ya que regulariza la calidad de un año a otro disminuyendo la acidez que es tanto mayor cuanto mayor es la riqueza en ácido málico de la uva, contribuyendo a la estabilidad microbiológica del producto final (Moreno-Arribas, 2003).

Las modificaciones que las BL producen en la calidad y composición del vino se conocen cada vez más gracias a las nuevas técnicas de análisis instrumental. Los conocimientos sobre la fisiología, metabolismo y genética de las BL del vino han experimentado un avance espectacular en los últimos años, pero aún quedan aspectos importantes sin comprender (Murat, et al., 2007).

1.1.2. Bacterias lácticas

Las BL son los agentes de la FML, cuyo origen en el vino puede ser la vendimia, la maquinaria e instalaciones de la bodega o incluso el aire (Garijo, et al., 2008). Pero también, pueden ser exógenas o añadidas mediante un cultivo o preparación industrial. Presentan algunas características generales comunes: son Gram positivas, catalasa negativas, no esporuladas, anaerobias facultativas y fermentadoras de azúcares en diversas condiciones. El producto principal de su metabolismo es el ácido láctico.

Figura 2. Bacterias lácticas en vino. Fuente: fotos tomadas de internet.



Para realizar su clasificación se tiene en cuenta su morfología (Figura 2), cocos (forma esférica) y bacilos (forma alargada) y su comportamiento frente al catabolismo de azúcares que viene determinado según el carácter homofermentativo o heterofermentativo. Por un lado, las bacterias homofermentativas producen más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa y/o fructosa, mientras que, las heterofermentativas producen además de ácido láctico, etanol, gas carbónico y ácido acético en cantidades variables según las cepas. Los cocos del género *Pediococcus* son homofermentativos, mientras que *Leuconostoc* y *Oenococcus* son heterofermentativos. Los *Lactobacillus* pueden presentar los dos comportamientos.

En la tabla 1, se expone una clasificación de las BL que puede ser susceptible de modificaciones debido a los cambios en la identificación de nuevos aislamientos bacterianos a partir del vino, así como a los avances de las técnicas de biología molecular empleadas para identificar los aislamientos.

Tabla 1. Especies de BL más frecuentes en mostos y vinos. Fuente: López, 2009.

Morfología celular	Naturaleza	Especies	Ácido láctico fermentado
Cocos	Homofermentativo	<i>P. damnosus</i>	L (+) D (-)
		<i>P. parvulus</i>	L (+) D (-)
		<i>P. pentosaceus</i>	L (+) D (-)
		<i>P. acidilactici</i>	L (+) D (-)
	Heterofermentativo	<i>Ln. mesenteroides</i> <i>O.oeni</i>	D (-) D (-)
Bacilos	Heterofermentativo	<i>L. casei</i>	L (+)
	facultativo	<i>L. plantarum</i>	L (+) D (-)
	Heterofermentativo	<i>L. brevis</i>	L (+) D (-)
		<i>L. buchneri</i>	L (+) D (-)
		<i>L. delbrueckii</i>	L (+) D (-)
		<i>L. fermentum</i>	L (+) D (-)
		<i>L. fructivorans</i>	L (+) D (-)
		<i>L. hilgardii</i>	L (+) D (-)
		<i>L. kunkee</i>	L (+) D (-)
		<i>L. nageli</i>	L (+) D (-)
		<i>L. trichodes</i>	L (+) D (-)

P (*Pediococcus*); *Ln* (*Leuconostoc*); *O*: *Oenococcus*; *L* (*Lactobacillus*).

1.1.3. Ecología y desarrollo de las BL en el vino

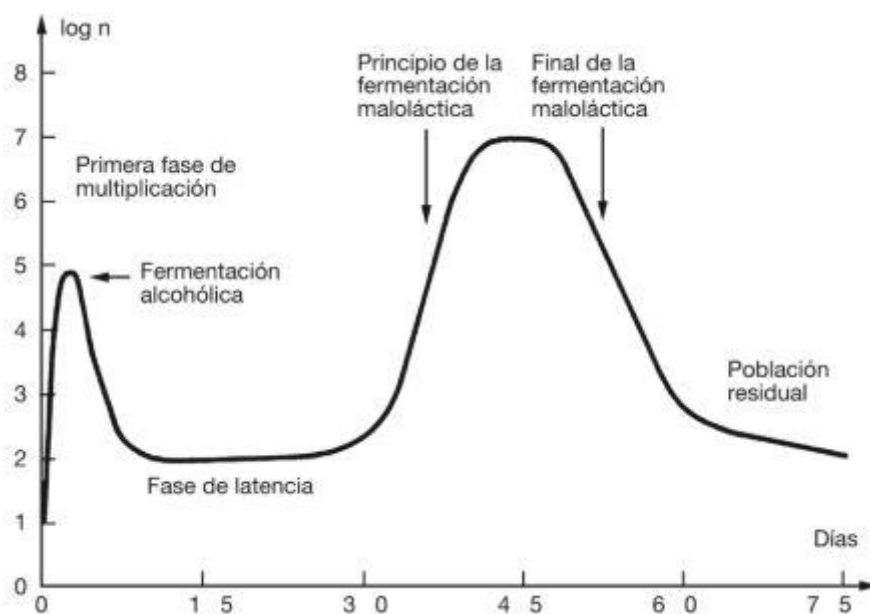
La población de bacterias lácticas indígenas se encuentra en las uvas en un número inferior al de levaduras y bacterias acéticas, alcanzando recuentos inferiores a 100 células/g (Peynaud, 1967). En estudios sobre el ecosistema microbiano de la uva por la técnica PCR-DGGE, llevados a cabo por Renouf et al. (2005, 2007), se identifican en el momento de la madurez bacterias de la especie *O.oeni*, *P. parvulus*, *Lactobacillus spp.* y *Ln. mesenteroides*.

En las horas posteriores al estrujado de la vendimia se produce un incremento de la población de hasta 10³-10⁵ UFC/ml (López, 2004), formando parte de un complejo sistema de especies de levaduras y bacterias cuyo origen puede ser tanto la uva como las instalaciones y el material de bodega. Las especies identificadas en esta fase fueron: *L. plantarum*, *L. casei*, *L.*

hilgardii, *L.brevis*, *L. fructivorans*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus*, *Ln. mesenteroides* y *O. oeni* (Edwards & Jensen, 1992; Lonvaud-Funel, 1999). Su número y proporción dependen de las condiciones de maduración, del estado de la vendimia y de las interacciones entre las especies de microorganismos que colonizan el medio (Lonvaud-Funel, 2006).

En las condiciones normales de vinificación (con sulfitado de vendimia) la multiplicación de las BL se realiza de forma pasajera para dejar paso a las levaduras (Figura 3). Cuando se inicia la FA y la población de levaduras se encuentra en fase de crecimiento exponencial, la población de BL desciende hasta 10^2 UFC/ml llevándose a cabo una selección de las cepas más resistentes al etanol, siendo *O.oeni* la especie mayoritaria identificada cuando finaliza la FA (Du Plessis *et al.*, 2004; Renouf *et al.*, 2006). Cuando ha terminado por completo la actividad de las levaduras, la población de BL, principalmente compuesta por *O.oeni*, prosigue su adaptación al medio, se produce su multiplicación, y cuando alcanza una población de $10^5 - 10^7$ UFC/ml, comienza a producirse la degradación de ácido málico (Reguant, 2001), siendo *O.oeni* la principal especie responsable de la misma (López, *et al.*, 2007).

Figura 3. Evolución de la población de BL en una vinificación. Fuente: Ribéreau-Gayon, *et al.*, 1998.



Sin embargo, en algunos casos, se ha observado que *L. plantarum* y *Pediococcus spp.* han participado en la transformación del ácido málico en ácido láctico (López, *et al.*, 2008b).

Tras el consumo de la práctica totalidad del ácido málico, en el vino permanece una importante población bacteriana, que depende de las condiciones y del tratamiento aplicado al mismo. Con un pH bajo, la adición de dióxido de azufre (SO_2) conlleva a una pérdida paulatina

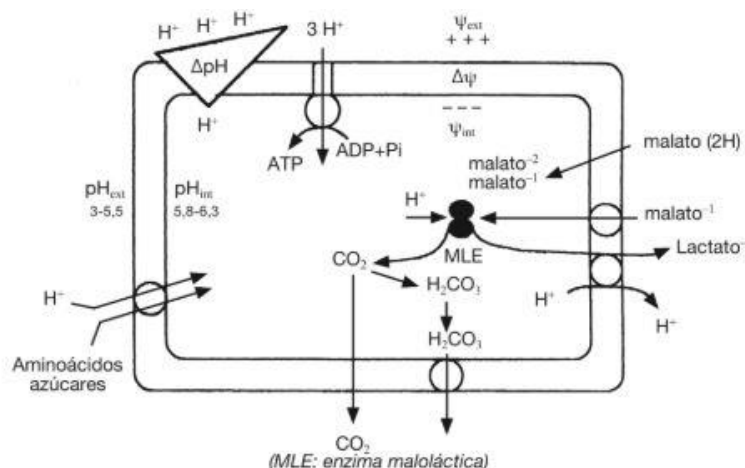
de la viabilidad de estas bacterias haciendo que mueran progresivamente, mientras que con un pH superior a 3,5, su población puede seguir creciendo (Krieger, 2006), por lo que es aconsejable una estabilización temprana del vino. En este momento, la microbiota puede ser de nuevo mixta y puede estar compuesta por diversas especies de *Pediococcus* y *Lactobacillus*, además de *O. oeni*.

1.1.4. Mecanismo bioquímico de la FML

El metabolismo de la FML en la célula de la bacteria consiste en la captación de ácido L (-) málico, su descarboxilación a L (+) láctico y CO₂ y la excreción de los productos finales, incluyendo un protón (Versari, et al., 1999). La descarboxilación se encuentra catalizada por el enzima maloláctico, en presencia de NAD⁺ y Mn²⁺.

A día de hoy no está bien aclarado el papel de la FML en el metabolismo celular (Figura 4) ya que es una reacción que no aporta energía ni poder reductor a la célula de forma directa, aunque de manera indirecta constituye una fuente de energía real para ella. En las últimas décadas se ha investigado mucho acerca del dudoso beneficio de la conversión maloláctica a la célula de la bacteria (Costello, 2005). Por ella misma parece desfavorable para las BL, a pesar de que supone una desacidificación, y, por tanto, un incremento de pH, ya que provee de muy poca energía libre ($\Delta G = -8,3$ KJ/mol) y no suministra energía asimilable en forma de ATP. Asimismo, aunque el NAD⁺ es un cofactor esencial, no tiene una función de oxidación-reducción, por lo que no hay cambio neto en el estado redox (Boulton, et al., 1998). Por consiguiente, la FML no es una verdadera fermentación, si bien la existencia y utilización del ácido málico promueve notablemente la velocidad de crecimiento de las BL.

Figura 4. Mecanismo de generación de energía metabólica a partir de la FML. Fuente: Flanzy, 2000.

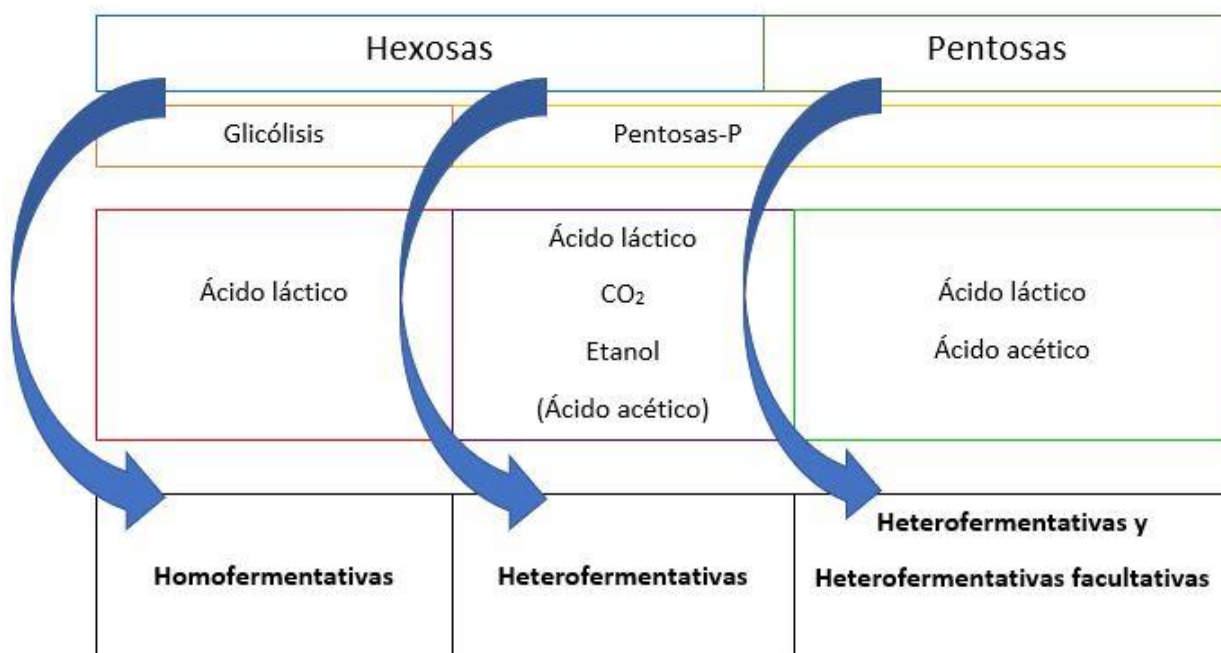


1.1.5. Metabolismo de las BL

Los azúcares, el ácido málico, el ácido cítrico, el ácido tartárico y los aminoácidos constituyen un número importante de sustancias presentes en el vino capaces de ser metabolizados por las BL (García, et al., 1992). En la mayoría de los casos, se pueden producir las correspondientes enfermedades o alteraciones que pueden anular la calidad de los vinos, exceptuando el ácido málico que desaparece del vino por medio de la FML.

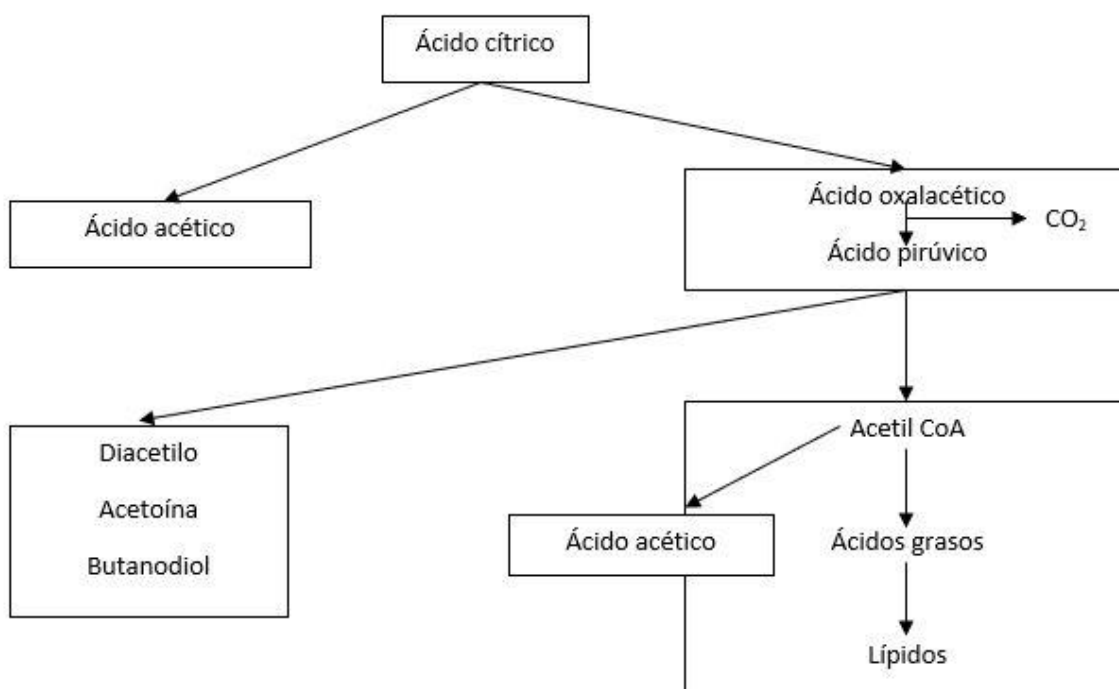
Las BL consiguen la energía que necesitan mediante el empleo de la vía fermentativa (Figura 5) catabolizando los azúcares (principal sustrato). Tras la FA, durante la multiplicación de las BAL, sólo perduran los azúcares que no han sido fermentados por las levaduras, normalmente suelen ser algunos cientos de mg/l de glucosa y fructosa y las pentosas del mosto de uva (arabinosa y xilosa). Estos azúcares residuales proporcionan la energía suficiente para la formación de la biomasa que llevará a cabo la FML. La generación de ácido acético a partir de los azúcares siempre es limitada siendo importante únicamente en el caso de accidentes en la FA, si la competencia entre BAL y levaduras se inclina a favor de las primeras o si la FA se interrumpe dando lugar al 'picado láctico' en cuya situación se fermentan varios gramos de hexosas por litro, y se incrementa la acidez volátil. Esta situación es peligrosa sobre todo cuando tanto el pH de la vendimia como la concentración de azúcares son muy elevados.

Figura 5. Distintas vías de fermentación de los azúcares por las BL. Fuente: (Lonvaud-Funel, 2006).



Las BL tienen la capacidad de metabolizar los principales ácidos orgánicos procedentes de la vendimia como el ácido cítrico (Figura 6), el ácido málico y el ácido tartárico. El ácido cítrico es un compuesto, que se encuentra en la uva en concentraciones en torno al 0,1- 0,7 g/l, empleado por las BL cuando se desarrolla la FML, o incluso posteriormente, de forma más lenta que el ácido málico. Su importancia radica en su vía metabólica (Figura 6) ya que, por una parte, conduce a ácido acético aumentando la acidez volátil, y, por otra parte, a las moléculas acetoínicas siendo el diacetilo la más importante. Las BL que degradan el ácido cítrico son cocos heterofermentativos (*Leuconostoc* y *Oenococcus*) y bacilos heterofermentativos facultativos (*L. casei* y *L. plantarum*), mientras que los cocos homofermentativos (*Pediococcus*) y los bacilos heterofermentativos no lo realizan (Hidalgo Togores, 2011).

Figura 6. Vía de degradación del ácido cítrico por las BL. Fuente: (Lonvaud-Funel, 2006).



El diacetilo es un compuesto aromático que contribuye al bouquet del vino y a su complejidad cuyo olor se corresponde con el de la mantequilla. Pero si se encuentra en concentraciones superiores a 8-9 mg/l puede resultar desagradable (Bartowsky, 2005). Puede ser reducido por células activas de bacterias o de levaduras a productos menos aromáticos como el cetoalcohol, acetoína y el 2,3- butanodiol debido a que es químicamente inestable.

Las disminuciones del ácido tartárico observadas durante la FML son debidas principalmente a su insolubilización. Aunque, a veces, tras el total consumo de los ácidos málico y cítrico, el ácido tartárico puede ser degradado por algunas cepas de *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. arabinosus*, originando una enfermedad conocida como ‘vuelta’ o ‘rebote’ caracterizada por la sensible disminución de la acidez fija del vino, el aumento de la acidez volátil y la aparición de un olor característico a col cocida. Este fenómeno se suele dar en vinos de zonas cálidas, con un pH superior a 3,5 y un bajo nivel de SO₂, que facilita el desarrollo de algunos *Lactobacillus*. No suele ser frecuente, ya que las cepas capaces de degradar el ácido tartárico son poco numerosas.

La necesidad de los aminoácidos por las BL es muy grande, la utilidad principal es la síntesis de proteínas, aunque dependiendo de las cepas, algunos pueden ser catabolizados y servir de fuente de energía. La evaluación cuantitativa de estos compuestos en la participación del crecimiento de las BL es muy difícil debido a que el vino es un medio muy complejo en el que es posible que simultáneamente se consuman y liberen aminoácidos.

Otros compuestos necesarios para las BL, que no son capaces de sintetizar, son las vitaminas del grupo B, siendo las más importantes: la tiamina, el ácido nicotínico, la biotina y el ácido pantoténico. Las necesidades de estas sustancias varían en función de la cepa. Entre otros agregados que también son necesarios se encuentran: el NAD⁺ empleado por el enzima maloláctico que cataliza la descarboxilación del L-malato, el Mn²⁺ como catalizador, el magnesio y potasio como cofactores de enzimas imprescindibles del metabolismo y el fósforo que como en toda célula, constituye ácidos nucleicos, fosfolípidos y tiene un papel fundamental en el almacenamiento de energía en forma de ATP (Ribéreau-Gayon, et al., 1998).

1.2. Factores que influyen en la FML

Cuando acaba la FA, puede tener lugar de forma espontánea la FML, aunque este desarrollo natural es impredecible. Este proceso no siempre se lleva a cabo, o no se da en el momento adecuado ni en condiciones óptimas, debido a que en el crecimiento y desarrollo de las BL del vino influyen muchos factores, y por consecuencia, en la FML. Entre ellos destacan:

1.2.1. Factores agronómicos

Generalmente, todos los factores que tienen influencia en el contenido de ácido málico en la uva inciden en la FML. Entre ellos, destacan: la variedad de vinífera, las técnicas de cultivo (García-Escudero, 2005, 2007), la maduración de la uva y el estado sanitario (Lonvaud-Funel, 1995). Estas son algunas de las razones, aunque no todas, por las que la duración de la FML puede variar de un año a otro (Loubser, 2004), siendo particularmente difícil inducirla con niveles de ácido málico inferiores a 0,8 mg/l.

1.2.2. Factores tecnológicos

La forma en que se lleve a cabo la vinificación tiene influencia en la FML. Por ejemplo, en la elaboración por maceración carbónica habitualmente la fermentación es rápida e incluso las dos fermentaciones (FA y FML) pueden superponerse. Por otro lado, las BL se desarrollan principalmente en el sombrero durante la FA, por lo que descubres tempranos empobrecen el medio, sin embargo, maceraciones prolongadas crean un entorno favorable para las BL (Delteil, 2004, 2005). El tamaño grande de los depósitos puede relacionarse con retrasos en el inicio de la FML debido a la compactación de las lías que contienen las BL.

1.2.3. Factores físico-químicos

Normalmente, los vinos con **pH** superior a 3,3 no presentan muchos problemas para realizar la FML, mientras que, a menor pH pueden encontrarse inconvenientes. Un pH elevado facilita la degradación del ácido málico presente en el vino, y a su vez, puede ser beneficioso para la proliferación de cepas de BL que pueden tener un efecto negativo en la calidad del vino.

Otro factor importante es el **anhídrido sulfuroso** que actúa como agente antibacteriano debido a que en su forma libre y al pH intracelular reacciona con constituyentes celulares haciendo que se retrase el crecimiento o incluso provocando la muerte bacteriana por inhibición de la actividad ATPasa de la membrana celular (Carreté, et al., 2002). El SO₂ combinado cuenta con propiedades antibacterianas entre 5 y 10 veces más débiles que las del SO₂ libre. En cualquier caso, es la fracción molecular, dependiente del pH del vino, la única manera en la que esta molécula atraviesa la pared celular. Para inhibir el crecimiento de las BL en un vino tinto basta con adicionar 0,5 mg/L de anhídrido sulfuroso en su forma molecular (Zamora, 2005).

El siguiente agente importante que inhibe el crecimiento de las bacterias por su interacción con los lípidos de membrana es el **etanol**. Este compuesto es muy tóxico para la mayoría de microorganismos, aunque el crecimiento de las BL del vino se ve estimulado por pequeñas cantidades del mismo (menos del 4% v/v). Su tasa de crecimiento disminuye de manera lineal y progresiva hasta una concentración de etanol del 14% (Suárez & Iñigo, 2004).

Otro factor físico químico que cobra bastante relevancia es la **temperatura**, cuya influencia en la FML no afecta sólo a la velocidad de crecimiento de las bacterias, sino también a la duración de su período de latencia (Bauer & Dicks, 2004). A su vez, agrava el efecto tóxico de sustancias como el anhídrido sulfuroso y el etanol. La FML en el vino se puede dar en un extenso rango de temperaturas (10-32°C) en función de las cepas de BL, situándose el punto óptimo cerca de los 20°C y siguiendo un desarrollo mucho más lento tanto por debajo de los 15°C como por encima de los 30°C. Si las condiciones de temperatura no son favorables, es presumible que la FML tenga lugar en primavera ya que es cuando se elevan las temperaturas. Para limitar los riesgos de desviaciones se recomienda conducirla a una temperatura tan baja como sea posible (18 a 20°C).

Todos estos factores: SO₂, pH, etanol y temperatura, están interrelacionados en la FML, siendo necesario tener en cuenta su sinergia por el efecto que tienen en su conjunto (Kyne & Gertsen-Briand, 2006).

Otros agentes relevantes son los compuestos fenólicos y los ácidos grasos de cadena media. Los compuestos fenólicos dificultan el crecimiento, supervivencia y estado fisiológico de las bacterias (Figuereido, et al., 2008). Generalmente, cuando los vinos son ricos en polifenoles, la FML se desarrolla con más dificultad. Respecto a los ácidos grasos de cadena media producidos por el metabolismo de las levaduras, puede disminuir la tasa de crecimiento de las BL. Carreté, et al. (2002) y Alexandre *et al.* (2004) indicaron que el antagonismo entre levaduras y bacterias puede ser explicado por la producción de ciertos ácidos grasos de cadena media.

1.2.4. Factores microbiológicos

La selección natural de los microorganismos implicados en la vinificación se debe por una parte a las modificaciones de las condiciones del medio (composición, potencial de oxidorreducción, etc.) y por otra, a las interacciones entre ellos, tanto antagonicas como sinérgicas.

Las levaduras se encuentran bien adaptadas al crecimiento en el mosto, es por ello que dominan sobre las bacterias hasta el final de la FA. Los efectos que ejercen sobre el crecimiento de las BL pueden ser de tres tipos: inhibición debido a la competencia por los nutrientes o a la producción de metabolitos inhibidores, estimulación por suministro de nutrientes, o un efecto neutro. Las condiciones del medio, en particular el pH y el sulfitado de la vendimia tienen un papel muy importante en la evolución de los cultivos mixtos, ya que un pH elevado favorece el crecimiento de las bacterias siendo las inhibiciones provocadas por las levaduras relativamente menos importantes, ocurriendo lo contrario a pH bajo. Mientras que, el sulfitado limita la supervivencia y el crecimiento de las BL al principio de la vinificación.

En cuanto a las interacciones que se dan entre las bacterias lácticas: estos microorganismos pueden sintetizar y liberar sustancias con actividad antimicrobiana como: peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, acetaldehído, etc.... Algunas de ellas son capaces de crear y segregar al medio sustancias de naturaleza proteica como son las bacteriocinas (Rojo-Bezares, et al., 2007) que tienen poder antimicrobiano frente a otras bacterias que compiten en el mismo medio. La producción de esta sustancia supone un método de competencia frente a otros microorganismos, teniendo un papel fundamental para que una cepa bacteriana determinada se imponga frente al resto, conquistando el medio y siendo la responsable de llevar a cabo la FML.

Finalmente, pueden darse otras interacciones debido a la presencia en el medio de hongos, virus bacteriófagos y bacterias acéticas que también puede dificultar el crecimiento de las BL.

1.3. Influencia de la FML sobre la composición del vino

Las actividades metabólicas de las BL pueden ser favorables, no tener consecuencias o ser totalmente perjudiciales para la calidad de los vinos. Los primeros sustratos susceptibles de ser metabolizados son las moléculas simples, los azúcares y los ácidos orgánicos, mientras que otras sustancias del vino más complejas como pueden ser los compuestos fenólicos, compuestos aromáticos o precursores de aromas, son parcialmente metabolizadas.

1.3.1. *Efectos beneficiosos*

Como se ha comentado previamente, la FML origina la desacidificación y el suavizamiento del vino, convirtiéndose en el principal cambio organoléptico. Este efecto se produce al reemplazar el ácido málico, dicarboxílico, de carácter duro y agresivo en boca, por el ácido láctico, monocarboxílico y menos agresivo para las papilas gustativas.

A su vez, también origina cambios en el perfil aromático de los vinos, favoreciendo la producción de compuestos como: acetato de etilo, lactato de etilo, acetato de isoamilo, 2-fenil etanol, alcoholes superiores, ésteres etílicos de ácidos grasos, diacetilo, succinato de dietilo, butirólactona (Tosi, et al., 2007). En líneas generales, tras la FML, los aromas se vuelven más complejos. La terminología positiva más empleada para describir vinos que han sufrido la FML son: mantequilla, nueces, caramelo, miel, vainilla, especiado, tostado, suavidad, redondez y larga sensación retronasal. Mientras que los negativos son: aromas lácteos intensos, sudor, cuero mojado, tonos mantecosos, amargor y gusto animal retronasal (Palacios, et al., 2004).

Otros efectos de este proceso son el incremento de redondez en boca y la disminución de la astringencia, produciendo así un efecto beneficioso en la calidad gustativa de los vinos. La formación de lactato de etilo contribuye a la sensación de volumen que la FML comunica a los vinos (Henick- Kling, 1993).

Durante la FML las reacciones de condensación de taninos-antocianos que se producen, modifican el color y lo estabilizan, contribuyendo a una disminución de la astringencia (Vivas, et al., 1997). Por otro lado, durante la FML el medio se empobrece en nutrientes y se sintetizan

inhibidores microbianos (bacteriocinas, ácidos orgánicos) haciendo que el vino sea más resistente a otras alteraciones producidas por microorganismos.

1.3.2. Efectos perjudiciales

Uno de los efectos perjudiciales más relevante es el aumento de pH variable (de 1 a 3 décimas) de acuerdo al contenido de ácido málico inicial, el pH del vino y su capacidad tampón (Bartowsky, 2005). De manera general, se puede afirmar que la fermentación de 1 g/L de ácido málico disminuye la acidez total una media de 0,6 g/L en ácido tartárico, produciéndose 2 gramos de ácido láctico por cada 3 gramos de ácido málico transformado.

Otra consecuencia relevante de este proceso es el aumento de la acidez volátil debida a la degradación del ácido cítrico y de los azúcares residuales. A su vez, como se ha descrito previamente, el picado láctico es una de las alteraciones que pueden llevarse a cabo durante la vinificación si el crecimiento bacteriano tiene lugar antes de que concluya la FA, cuando aún quedan más de 4 o 5 g/l de azúcares reductores por degradar en el vino.

El ácido cítrico también puede ser empleado para producir diacetilo tras su degradación por las BAL. Concentraciones superiores a 8-9 mg/L de este compuesto en vinos tintos proporcionan aromas lácteos desagradables.

Una FML realizada sin control produce la desaparición del afrutado de los vinos dado que determinadas cepas de BL reducen el contenido en ésteres degradando o enmascarando los aromas varietales.

Otro resultado perjudicial de este proceso es la pérdida de color producido por varios motivos: el incremento de pH que ocasiona la decoloración de los antocianos; la hidrólisis del enlace glicosídico de los antocianos glicosilados por la acción enzimática de las BL y la adsorción de antocianos por las paredes celulares de las bacterias y procesos de precipitación (Suárez & Íñigo, 2004).

El gusto a ratón es otro efecto derivado de este proceso de fermentación en el que se forman aromas desagradables. Su origen se encuentra en la formación de bases heterocíclicas aromáticas por parte de determinadas cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Oenococcus*, a partir de la degradación del aminoácido lisina en presencia de etanol (Costello & Henschke, 2002). A su vez, las BL pueden degradar el ácido sórbico, formando etoxy-hexadieno, sustancia identificada como aroma a 'geranio'. Los aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina

son metabolizados por las BL para formar diferentes compuestos azufrados entre los que destacan el ácido sulfhídrico y el metano-tiol (Lonvaud-Funel, 2006).

La glicerina es producida en el transcurso de la FA en concentraciones de 4 a 12 g/L, y puede ser empleada por las BL dando lugar a la enfermedad del amargor. Ciertas cepas de *Lactobacillus* son capaces de degradar el glicerol para producir acroleína, que se combina con los polifenoles del vino y forman moléculas de sabor amargo. No es muy frecuente debido a que pocas cepas de BL tienen la capacidad de degradar el glicerol por esta vía.

La enfermedad de la vuelta es otra consecuencia derivada de la FML en la que algunas cepas de BL de las especies *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. arabinosus* metabolizan el ácido tartárico. Esta alteración está caracterizada por una disminución de la acidez total, un incremento de la acidez volátil y un olor a col cocida.

Otra alteración relevante es el 'ahilado' o 'grasa' en la que algunas bacterias pueden sintetizar polisacáridos exocelulares en la parte exterior de las paredes celulares. No suele ser grave, aunque sea muy escandalosa. Para eliminarlo se debe agitar vigorosamente para detener la unión entre bacterias y luego eliminarlas por filtración.

Otro de los inconvenientes más destacados y que mayor peligro genera derivado del metabolismo bacteriano es la acumulación en vino de aminas biógenas. Las aminas biógenas son bases nitrogenadas orgánicas de bajo peso molecular que pueden formarse en alimentos y bebidas fermentados por descarboxilación de aminoácidos libres. En el vino, esto ocurre por la acción de las enzimas de descarboxilasa microbianas, a partir de los precursores de aminoácidos correspondientes. Esta reacción generalmente depende de la cepa en lugar de ser específica de la especie. Altas concentraciones (de 1 a 100 mg/L) de aminas biógenas pueden causar efectos fisiológicos indeseables en humanos sensibles, especialmente cuando el alcohol y el acetaldehído están presentes (Maintz y Novak 2008; Spano et al. 2010). Actualmente se cree que la principal fuente de aminas biógenas en el vino es el metabolismo de las BAL, ya sea durante o después de la FML (Lonvaud-Funel 2001; Polo et al. 2011; Smit et al. 2012). Por lo tanto, es deseable elegir cepas de cultivo iniciador de FML que no produzcan aminas biógenas.

1.4. La variedad Maturana Tinta

Es una variedad que presenta una fertilidad alta, un racimo pequeño y compacto, así como bayas también pequeñas y con forma ligeramente elíptica (Figura 7). Muy vigorosa y muy sensible a la *Botrytis*, la brotación es tardía, pero la maduración es precoz (Consejo Regulador

D.O.Ca Rioja, 2019). Los resultados de los análisis con marcadores moleculares indican que la variedad Maturana tinta es muy distinta a Maturana blanca y de la Merenzao (que en un primer momento se registró como Maturana tinta); No tiene ninguna sinonimia. El único análisis de ADN realizado hasta el momento para esta variedad, con nueve microsatélites, ha detectado una cierta proximidad con la variedad Espadeiro existente en Galicia (Martínez de Toda, 2011). Al no cultivarse en ningún otro lugar del mundo, su cultivo resulta muy interesante para aumentar la originalidad, diferenciación y diversidad de los vinos de Rioja (Martínez de Toda et al., 2013).

Figura 7. Hoja y racimo de Maturana Tinta. Fuente: Web ACENOLOGIA.



Esta variedad da lugar a vinos con una intensidad de color y contenido en antocianos elevado, tiene una acidez alta y un grado alcohólico medio. En el análisis sensorial destaca su color rojo violeta; aromas de carácter vegetal típicos varietales, con predominio de pimiento verde y también balsámicos y de especias de paladar estructurado. En aroma puede resultar interesante, pero en boca es una variedad ligera, con sensación elevada de acidez, astringencia, amargor y alcohol, con de persistencia media (Consejo Regulador D.O.Ca Rioja, 2019). Su interés en la elaboración radica en que aumenta la originalidad, diferenciación y diversidad de los vinos ya sea en la elaboración de monovarietales o en la realización de coupage.

2. OBJETIVO

Como se ha comentado previamente, la FML produce una mejora en la estabilidad de los vinos y también en las características organolépticas por el incremento de la redondez, complejidad y sensaciones en boca. Pero, por otro lado, disminuye la acidez, provoca pérdidas de color y de aromas, y aumenta la acidez volátil y las aminas biógenas. Por sus características hay variedades como la Maturana Tinta que son más sensibles a estos efectos negativos de la FML, por lo que algunas bodegas se han planteado incluso no realizar esta transformación. Se ha señalado que la FML provoca en esta variedad una disminución en la calidad organoléptica debido a reducciones que conducen a la obtención de vinos sosos al paladar, y en ocasiones con excesiva acidez volátil. Por ello en estos casos, se deberá tener un especial cuidado en la elaboración.

El objetivo principal de este trabajo fue el estudio del desarrollo y resultado de la FML en vinos de Maturana tinta llevada a cabo mediante la inoculación de tres bacterias lácticas seleccionadas, así como, buscar una causa para la elevada acidez volátil que presentan los vinos de Maturana Tinta elaborados en Viña Ijalba.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas de bacterias empleadas

Las cepas de *Oenococcus oeni* empleadas en la experiencia fueron Uvaferm ALPHA MBR (LOTE:113925021006) y dos cepas de la bacteria LALVIN SILKA (CI4 MBR. Lot: 4942 y CI4-2 MBR, Lot: 2047), todas ellas proporcionadas por la empresa Lallemmand. La bacteria SILKA es una cepa autóctona de La Rioja que durante la realización de estos ensayos se encontraba en la fase previa de su uso industrial.

3.1.1. Uvaferm ALPHA ®

Uvaferm ALPHA fue seleccionada por el Instituto Francés de la Viña y del Vino (IFV) por su alto porcentaje de supervivencia después de la inoculación en el vino, su dominancia durante la fermentación maloláctica (FML) y su capacidad para alcanzar una FML fiable en condiciones muy diferentes de vinos blancos y tintos, ya que es una cepa de *Oenococcus Oeni* (Lallemmand, 2018). Mejora la complejidad del aroma y la sensación en boca de los vinos (Figura 8) y no es capaz de producir histamina u otras aminas biógenas. Gracias a su buena implantación, ayuda a asegurar y preservar la calidad del vino. Se emplea sobre todo en la elaboración de vinos tintos.

3.1.1.1. Propiedades organolépticas

Figura 8. Propiedades organolépticas de la Uvaferm ALPHA. Fuente: Ficha técnica Lallemmand.



3.1.1.2. Propiedades microbiológicas y enológicas

- Tolerancia pH: >3,2.
- Tolerancia alcohol: hasta 15,5% vol.
- Tolerancia SO₂: hasta 50 mg/L SO₂ total.
- Tolerancia temperatura: > 14 °C.
- Baja demanda de nutrición.
- Buena implantación.
- Cinética FML: Rápida.
- Baja producción de acidez volátil.
- No produce aminas biógenas.
- Coinoculación recomendada.
- Sensible a la exposición excesiva de O₂.

3.1.2. LALVIN SILKA

Las dos cepas empleadas de esta bacteria pertenecen a la especie *Oenococcus oeni*. Se recomiendan para obtener vinos tintos sedosos cuya fermentación maloláctica se realiza en roble. Se aisló en la región de La Rioja en España. Ha sido seleccionado por el grupo GESVIN del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), durante un extenso programa de investigación desde 2006, a partir de 1000 aislamientos de diferentes bodegas. La cepa finalmente seleccionada ha sido testada en diversas variedades de uva, regiones, métodos de elaboración, etc... SILKA brinda propiedades sensoriales únicas al tiempo que responde a las demandas del cambio climático en climas cálidos (Lallemand, 2018). Debido a su origen y a su impacto sensorial, es muy adecuada para llevar a cabo la FML en contacto con el roble. En comparación con una FML espontánea, los vinos inoculados con ella tienen una mejor sensación de roble integrado, con una estructura elegante y presentan la mayor frescura aromática (Figura 9). Después de varios meses, los vinos elaborados con LALVIN SILKA aún son afrutados y frescos, mientras que, si comparamos con los vinos control, sus características son de aromas más maduros.

3.1.2.1. Propiedades organolépticas

Figura 9. Propiedades organolépticas de la bacteria SILKA. Fuente: ficha técnica de Lallemand.



Además de su buena resistencia al alto contenido de alcohol y la cinética regular de FML, tiene un impacto positivo en la redondez, suaviza la astringencia y la amargura de los vinos y permite lograr vinos tintos complejos y muy bien equilibrados, con una agradable persistencia aromática.

Las bacterias SILKA testadas en este trabajo se corresponden con dos lotes de la misma cepa producidos en condiciones diferentes.

3.1.2.2. Propiedades microbiológicas y enológicas

- Tolerancia al alcohol: 16 %.
- Tolerancia al pH: 3,3.
- Tolerancia total de SO₂: 60 mg/L.
- Demanda de nutrientes: Media.
- Tolerancia a la temperatura mínima: 15°C.
- Recomendable coinoculación.
- Baja producción de diacetilo durante la coinoculación.
- Moderada producción de diacetilo por inoculación después de la Fermentación alcohólica.
- No forma aminas biógenas.

3.2. Ensayo

La experiencia se realizó en la bodega Viña Ijalba, especialista en la elaboración de vinos monovarietales de Maturana tinta, durante la vendimia de 2017. La elección de esta variedad se fundamenta en que es una variedad tinta autóctona de Rioja, al igual que algunas de las bacterias utilizadas en la elaboración.

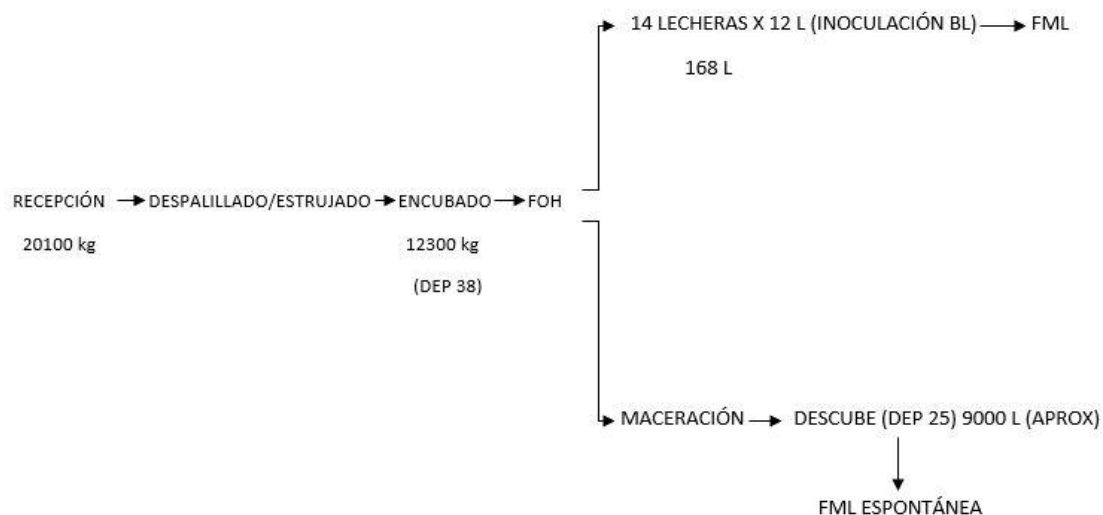
En la cosecha de 2017 se vendimiaron un total de 20.100 kg de dicha variedad, procedentes del municipio Villamediana de Iregua, de los cuales, 12.300 kg se introdujeron en el depósito 38 (tina de madera cuya capacidad es de 15.800 L).

Tras la finalización de la Fermentación Alcohólica el 29 de septiembre, se dejó un período de maceración de 11 días, en este tiempo se extrajeron los aromas y color del hollejo. El 9 de octubre, se llevó a cabo el descube del depósito en el que había tenido lugar la FA (el 38) trasladándose el vino al depósito 25 (acero inoxidable).

El 29 de septiembre se inició este trabajo, ya que fue la fecha en la que terminó la FA y todavía no había vestigios de la FML. A pesar de que el depósito siguió macerando, se extrajeron los litros de vino necesarios (unos 170) para llenar 14 lecheras de 12 L y realizar el estudio (Figura 10). En campañas anteriores se había observado un desarrollo espontáneo de la Fermentación Maloláctica bajo sombrero, que se quería evitar para tener un completo control de la misma.

Tras la finalización de la FML, las diferentes lecheras fueron conservadas en la bodega a temperatura ambiente. Los vinos procedentes de los diferentes ensayos se observaron periódicamente para tomar muestras con el fin de determinar la evolución de la acidez volátil.

Figura 10. Resumen de la realización práctica



3.2.1. Experiencia

La distribución de las muestras a estudiar fue la siguiente (Figuras 11 y 12): 3 lecheras inoculadas con la Bacteria Uvaferm ALPHA MBR (BL1a, BL1b, BL1c), 3 lecheras inoculadas con el lote CI4 de la bacteria LALVIN SILKA MBR (BL2a, BL2b, BL2c), 3 lecheras inoculadas con el lote CI4-2 de la bacteria LALVIN SILKA MBR (BL3a, BL3b, BL3c), 3 lecheras testigo, sin inoculación (T_1, T_2 y T_3) y 2 lecheras inoculadas con una dosis cuádruple de la Bacteria Uvaferm ALPHA (C_1 y C_2).

Figura 11. Disposición de las lecheras sobre el pallet.

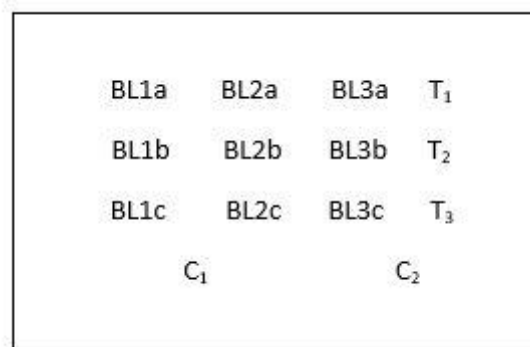


Figura 12. Disposición de las lecheras empleadas en la realización práctica.



Dado que las bacterias se encontraban en sobres en forma liofilizada (Figura 13), se optó por la inoculación directa pesando la cantidad recomendada de cada bacteria excepto a las lecheras C_1 y C_2 en las que se adicionó una dosis cuádruplicada de la bacteria Uvaferm ALPHA para estudiar su efecto en el color. En las lecheras testigo se dejó que la FML se llevara a cabo de forma espontánea.

Como se ha comentado previamente, las lecheras fueron inoculadas el día 29 de septiembre haciendo una toma de muestra cada dos días para conocer el contenido de ácido málico y láctico, así como el recuento de microorganismos presentes en las muestras y el control de implantación de las cepas sembradas. Estos análisis se realizaron en los laboratorios del ICVV.

Figura 13. Bacterias lácticas empleadas en la experiencia.



Todos los vinos se sulfitaron a razón de 3,5 g/Hl, una vez finalizadas las FML.

3.2.2. *Análisis físicoquímico de los vinos*

Tras la finalización de cada proceso (FOH, descube, FML) se llevó a cabo un análisis completo de los vinos:

3.2.2.1. Acidez Total

Se empleó el método propuesto por la Oficina Internacional de la Viña y el Vino, tras desgasificar la muestra, en el que se toman 10 ml de la muestra de vino, se añaden unas gotas de fenolftaleína y posteriormente se valora con NaOH N/4,9 (0,204 M), hasta alcanzar pH 7 (medido con un pHmetro). Esta solución alcalina está preparada de forma que, operando sobre este volumen de muestra, cada mililitro de reactivo equivalga a un gramo de acidez, expresada en g/L sulfúrico (García Barceló, 1990).

Para expresar la acidez en g/L de ácido tartárico, se multiplica el volumen gastado por 1,53.

3.2.2.2. Acidez volátil

Se empleó el método García Tena: tras degasificar la muestra y una vez encendido el refrigerante en el equipo de destilación, se tomaron 11 ml de muestra de vino y se colocaron en un matraz redondo esférico con dos bolitas (para homogeneizar las temperaturas). En la salida se colocó una probeta de 5,1 ml y una vez alcanzado ese volumen de destilado, se desechó y se colocó otra probeta de 3,2 ml para recoger una segunda fracción de destilado. Ese volumen se trasladó a un Erlenmeyer, se añadieron unas gotas de fenolftaleína como indicador y se valoró con NaOH 0,02 N hasta virar a un color rosado. Siendo v el volumen de sosa consumido, la acidez volátil se calcula como: $AV = 0,366 \times v$.

3.2.2.3. pH

Para la medida de pH se empleó un pHmetro de sobremesa previamente calibrado con soluciones tampón de pH 3 y 7.

3.2.2.4. Grado alcohólico

Se determinó el grado alcohólico de los vinos en base a su temperatura de ebullición mediante el empleo de un ebulómetro de sobremesa.

3.2.2.5. IPT

Después de degasificar los vinos, se colocaron 1 ml de las diferentes muestras en tubos de ensayo. Tras centrifugarlos 3 minutos, se realizaron diluciones 1:50 en matraces aforados y más tarde se llevaron a cubetas de cuarzo de 10 mm. En el espectrofotómetro se midió la longitud de onda a 280 nm (empleando como blanco agua destilada) y el resultado se multiplicó por 50 debido a la dilución.

3.2.2.6. Índice de Color

El tratamiento de las muestras de vino es el mismo que en los IPT, pero en este caso no se realizó ninguna dilución y se midió en cubeta de vidrio de 1 mm la absorbancia a las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm que posteriormente se sumaron. El resultado se multiplicó por 10 para obtener el índice de color final.

3.2.2.7. Ácidos málico, láctico y cítrico

Estos compuestos se determinaron mediante análisis enzimático empleándose el autoanalizador enzimático Miura One. Los resultados se expresaron en g/L.

3.2.3. *Toma de muestras para los controles microbiológicos*

Las muestras de vino recogidas en botes estériles durante la fermentación maloláctica se procesaron siguiendo el método de diluciones decimales seriadas y siembra en placa Petri con medio MRS-modificado al que se añadió pimaricina (50 mg/L) para impedir el crecimiento de levaduras. Las placas se incubaron en anaerobiosis (GasPak. Oxoid Ltd., Basingtoke, England) a 30°C durante 10 días, para evitar el posible crecimiento de bacterias acéticas y favorecer el crecimiento de las bacterias lácticas. Finalizado este período de incubación se realizó el recuento de bacterias totales viables en las placas con crecimiento entre 30 y 300 colonias, los resultados se expresaron como UFC/ml.

3.2.4. *Aislamiento y conservación de colonias de bacterias lácticas*

Se aislaron 20 colonias al azar de cada placa, que se sembraron en medio MRS agar modificado e incubaron a 30°C en anaerobiosis durante 48 h. Después de este periodo de tiempo, las bacterias aisladas se conservaron en viales con leche estéril al 20% (Skim-milk, Difco) a -20°C.

3.2.4.1. Identificación de las bacterias lácticas mediante PCR

La caracterización de las bacterias lácticas se realizó mediante dos análisis sucesivos de PCR. El primero de ellos permitió clasificar el aislado dentro de las bacterias lácticas, y el segundo dentro de la especie *Oenococcus oeni*.

Para la caracterización de las colonias bacterianas como pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas se utilizó el método descrito por Van de Klundert & Vliegenthart, (1993). Se basa en el estudio de ARNr 16S, que es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosómico ADNr 16S (ADN 16S). Estos ADNs constituyen una buena herramienta para el estudio y secuenciación de especies bacterianas, ya que su secuencia se ha mantenido muy conservada durante la evolución debido al papel estructural y fijo que desempeñan en el ribosoma. La secuencia del gen ADNr 16S presenta de forma aproximada 1.500 pb, y se compone de 9 zonas

variables V1-V9 y zonas conservadas. Los cebadores universales elegidos son complementarios a las zonas conservadas del inicio del gen, en la zona de 540 pb, y al final del gen. Las condiciones de la PCR y los cebadores empleados son los detallados en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores y condiciones de amplificación de la PCR universal de bacterias lácticas. Fuente: (Van de Kundert & Vliegenthart, 1993).

Cebadores (secuencia 5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)	Condiciones de amplificación		
rrs1 CGATTAGATACCCTGGTAGTCC	320	94°C	3 min	1 ciclo
		94°C	30 s	
rrs2 TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC		60°C	45 s	32 ciclos
		72°C	2 min	
		72°C	4 min	1 ciclo

Las cepas pertenecientes a la especie *Oenococcus Oeni* fueron confirmadas por PCR especie-específica mediante el método descrito por Zapparoli *et al.* (1998), con los cebadores y condiciones de PCR que se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores de PCR empleados para la identificación de la especie *Oenococcus Oeni* y condiciones de amplificación. Fuente: (Zapparoli, et al., 1998).

Cebadores (secuencia 5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)	Condiciones de amplificación		
Lo-1 TAATGTGGTTCTTGAGGAGAAAAT	1023	94°C	2 min	1 ciclo
		94°C	25 s	
Lo-2 ATCATCGTCAAACAAGAGGCCTT		64°C	2 min	30 ciclos
		72°C	2 min	
		72°C	8 min	1 ciclo

En todos los casos se incluyó una muestra control positivo y una muestra control negativo (con cebadores y sin ADN) para asegurar el buen funcionamiento de esta técnica.

Todos los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 1 hora y 30 min. Las colonias de bacterias cuya identificación no pudo confirmarse por esta última técnica fueron purificadas y secuenciadas por MacroGen Inc., Seúl, Corea. Para ello se utilizaron los fragmentos de ADN amplificados mediante la PCR universal de bacterias lácticas (Van de Kunderdt & Vliegenthart, 1993). Las secuencias resultantes se enfrentaron a la base de datos del NCBI para determinar la especie de bacteria láctica a la que pertenecía cada colonia aislada.

3.2.4.2. Control de implantación: tipificación de los clones de *Oenococcus oeni*

El control de implantación se llevó a cabo con los aislados procedentes de los muestreos en los que se había consumido el 20, el 60 y más del 80% del málico inicial, es decir, en el inicio, en plena y al final de la FML.

Las bacterias lácticas identificadas como *Oenococcus Oeni* se tipificaron a nivel clonal mediante PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) utilizando el enzima de restricción *SfiI*. Los pasos previos para la extracción del ADN genómico completo de estas bacterias son:

Lisis de la pared celular y preparación de los insertos

Los cultivos puros se sembraron en placas de MRS modificado sin pimaricina a 30°C y en anaerobiosis; de ellos se realizó una suspensión en 3 ml de solución salina estéril hasta alcanzar una turbidez equivalente al nº 1 en la escala de McFarland (BioMérieux® SA Marcy l'Etoile, France). Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante. Las células del pellet se resuspendieron en 100 µl de solución de lisozima (100 mg/ml), se homogeneizaron en vórtex y se incubaron a 37°C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y, eliminado el sobrenadante, se añadieron 100 µl de storage buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, pH 8). Se mantuvieron en un baño termostático a 50°C para atemperarlos, y se les añadieron 100 µl de agarosa de alta pureza (Bio-Rad) al 1% en storage buffer. La mezcla se resuspendió suavemente con micropipeta y se rellenaron dos pocillos por cada muestra, dejando solidificar los insertos a temperatura ambiente.

Ruptura de la membrana celular

La solución de ruptura de la membrana celular se preparó con 1 g/l de Proteinasa K disuelta en EDTA 0,5 M pH 9,5 y Sarcosyl al 20%, añadiendo 3 ml de esta solución a los insertos preparados (2 por muestra) e incubando a 56°C durante toda la noche.

Lavado de los insertos

- Con 8 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 50 mM, pH 8 a 56°C durante 15 min con agitación.
- Con 8 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 50 mM, pH 8, a temperatura ambiente durante 20 min con agitación (dos veces).
- Con 8 ml de Tris-HCl 10 mM a temperatura ambiente durante 20 min y con agitación (2 veces).

Los insertos pudieron guardarse, tras los lavados en Tris-HCl 10 mM a pH 8, en cámara a 4°C durante varios días.

Digestión enzimática con SFI

Después de los lavados el inserto, cortado en una pieza del tamaño del pocillo (1 a 2 mm) se colocó en un tubo eppendorf al que se adicionaron 100 µl del tampón del enzima, manteniéndose así durante 20 min a temperatura ambiente.

Después de eliminar este tampón, se añadieron 5U del enzima *SfiI* en 100 µl de su buffer, incubándose a 50°C durante toda la noche.

Tras la incubación se inactivó el enzima con 800 µl de tampón TBE 0,5x, manteniéndolos a 52°C durante 8 min.

Preparación del gel de agarosa

Se preparó un gel con agarosa de alta pureza (Bio-Rad) al 1% (p/v) en TBE 0,5x, dejándose solidificar a temperatura ambiente y se introdujeron los insertos tras la digestión enzimática, sellándose con agarosa atemperada a 50 °C. Como marcador de peso molecular se utilizó Lambda Ladder (Bio-Rad).

Electroforesis en campo pulsante

La cubeta de electroforesis de campo pulsante CHEF-DR III (Bio-Rad) se llenó con 2 L de tampón TBE 0,5x y cuando alcanzó 14 °C se sumergió el gel. Se emplearon pulsos de 5 a 45 s, a 5,5 V/cm durante 23 h. La velocidad de la bomba se fijó a 70 (0,75 l/min).

Tinción del gel

El gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio 1 µg/ml durante 15 min y se visualizó, analizó y fotografió en el equipo Image Store 5000 (UVP) (BIO-RAD) con el programa *QuantityOne*. En ocasiones los resultados mejoraron si el gel se mantenía en agua destilada con agitación suave durante 3 horas aproximadamente.

Análisis de los patrones de PFGE

Para la conversión, normalización y comparación de los perfiles electroforéticos obtenidos por PFGE, se empleó el análisis visual y el programa FP Quest™ (Bio-Rad). Esta herramienta informática permitió analizar los perfiles numérica y estadísticamente, empleando para ello el método estadístico UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Average linkage) y el coeficiente de correlación de Pearson.

3.2.5. Medios de cultivo y disoluciones

3.2.5.1. Medios de recuento y aislamiento para bacterias lácticas

- **MRS modificado (Man, Rogosa and Sharpe).**

MRS broth (Scharlau): 52 g.

D-fructosa: 6 g

DL-málico: 5 g.

L-cisteína HCl: 0.5 g.

Pimaricina: 50 mg.

Agar bacteriológico: 30 g.

Suero de tomate: 100 ml.

Agua destilada: 900 ml.

Se añadió pimaricina para impedir el crecimiento de levaduras. Se autoclavó a 121 °C durante 20 minutos y posteriormente se distribuyó en placas. Para el crecimiento de las bacterias lácticas aisladas se empleó el mismo medio, pero sin pimaricina.

3.2.6. *Análisis estadístico de los resultados*

Todos los datos obtenidos en este estudio (n=3) se emplearon para el cálculo de las medias y las desviaciones estándar. Además, se llevó a cabo el análisis de la varianza (ANOVA) de los parámetros fisicoquímicos de los diferentes vinos con la versión 23 de IBM® SPSS® Statistic. Se establecieron diferencias significativas utilizando la prueba post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta experiencia se estudió la posible mejora de los vinos de Maturana tinta controlando la FML mediante el empleo de bacterias seleccionadas, algunas autóctonas. Se trató fundamentalmente de controlar el aumento de acidez volátil que, normalmente se produce en estos vinos durante la FML.

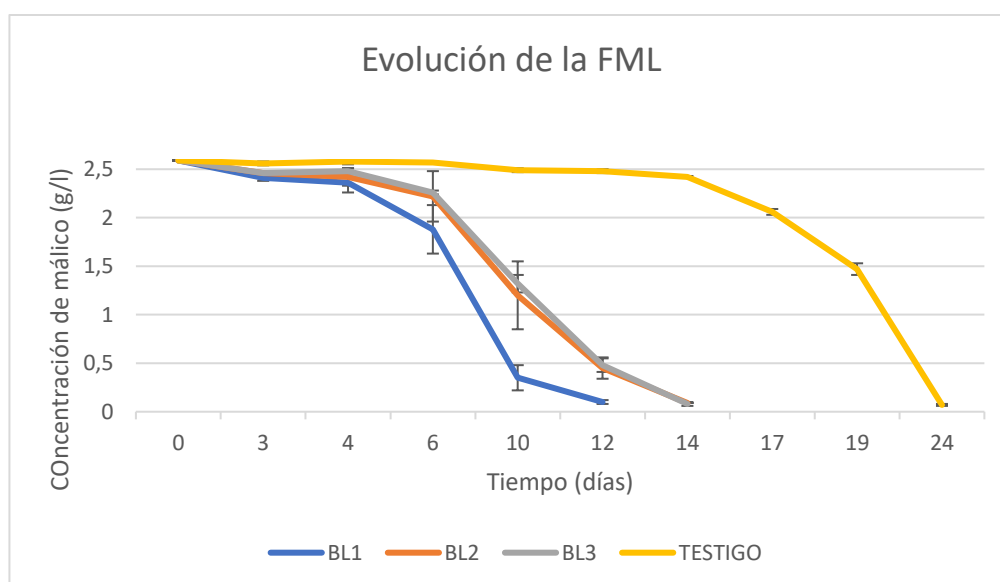
Los resultados de los depósitos C1 y C2 solamente se van a tener en cuenta al estudiar los datos referentes al color debido a que solo hay dos réplicas por muestra.

4.1. Evolución de la Fermentación Maloláctica

Como se ha comentado previamente en la introducción, el ácido málico es un indicador del avance la fermentación maloláctica ya que es el sustrato que las bacterias lácticas transforman en ácido láctico.

Para estudiar dicho proceso se puede realizar una representación del consumo del ácido málico en la que se normalmente se observará una gráfica lineal de tendencia descendente. Si lo que se representa es la producción de ácido láctico, se obtendrá el mismo tipo de gráfica, pero con una tendencia opuesta, es decir, ascendente. En este estudio se ha escogido la representación del ácido málico (Figura 14).

Figura 14. Evolución del ácido málico durante la Fermentación Maloláctica.



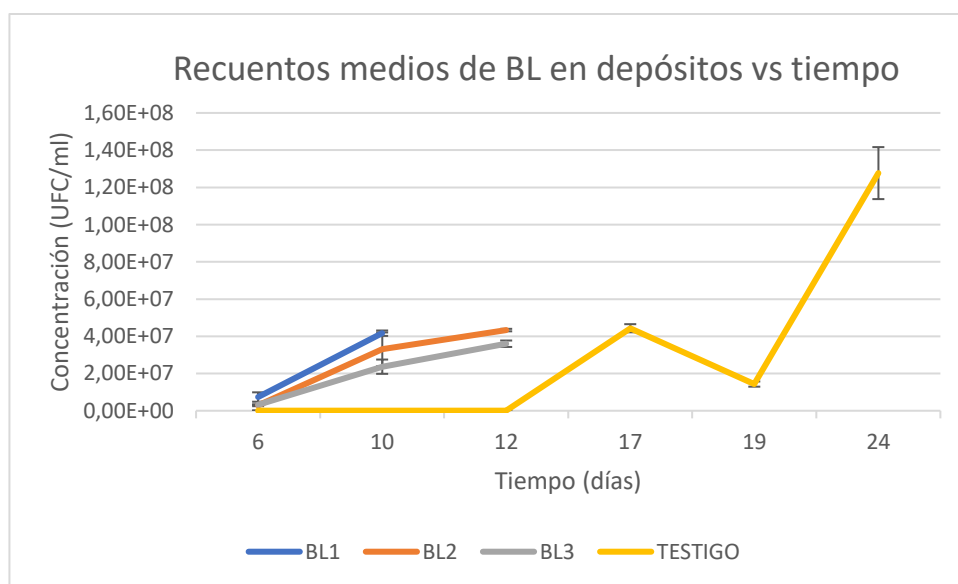
Como se aprecia en la figura 14, la concentración de ácido málico al inicio de la experiencia para todos los casos es la misma (2,59 g/L). A medida que avanza el tiempo, ésta va disminuyendo hasta llegar a prácticamente 0. Las lecheras inoculadas con bacterias lácticas

llegan antes a este valor que la testigo, y también inician antes el proceso. Por tanto, es evidente que la inoculación afecta en el tiempo que tarda en llevarse a cabo esta reacción, tanto en el arranque del proceso, como en llegar al final.

La FML está íntimamente relacionada con la población de bacterias que se encuentren en el medio. Observando la figura 14, es evidente que la siembra de bacterias lácticas hace que este proceso termine mucho más rápido que en las experiencias en las que no hubo inoculación. Comparando las inoculaciones de las tres bacterias, se observa que la UVAFERM ALPHA tiene una cinética ligeramente más rápida que las autóctonas (BL2 y BL3) presentando una diferencia de 2 días, mientras que, entre los dos clones de bacterias, la tendencia de la cinética es prácticamente es la misma.

El hecho de que el testigo tarde tanto en comenzar la FML puede deberse a la dificultad que presentan los microorganismos a la aclimatación al medio debido al elevado grado alcohólico que presenta (14,2%) debido a la alta sensibilidad de las BAL a este parámetro, cuanto más alto es, más difícil es iniciar la FML porque afecta mucho a la multiplicación de las bacterias. (Benito Sáez, 2017).

Figura 15. Recuentos medios de BL a lo largo de las FMLs.



A 10 días del llenado de las lecheras e inoculación de las bacterias (figura 15), la población que se apreciaba era muy diferente en los distintos depósitos. Ese día, las mayores poblaciones se encontraron en los depósitos sembrados con Uvaferm ALPHA, lo que concuerda con los menores valores de ácido málico reflejado en la figura 14 para esos vinos.

En el caso de los dos tipos de bacterias autóctonas (BL2 y BL3), a los 6 días de haber comenzado la experiencia la población para ambos tratamientos es prácticamente la misma, y

6 días después (día 12), ambos alcanzan su punto máximo siendo mayor para la BL1. En ese momento ya se había consumido la práctica totalidad de ácido málico. Los depósitos inoculados con esta cepa presentan mayor concentración de microorganismos lo que indica una mayor capacidad de adaptación y mayor consumo de málico demostrando, por tanto, una mayor efectividad. Aunque ambas cepas son el mismo clon, los lotes de fabricación son diferentes por las condiciones en las que se llevó a cabo la liofilización. Esto demuestra que las condiciones de producción tienen influencia en la posterior adaptación y desarrollo en el vino de las cepas.

Respecto a las fermentaciones espontáneas, el período de adaptación de las bacterias espontáneas al vino fue muy largo, lo que coincide con la mayor lentitud en la degradación del ácido málico observada en la Figura 14. Curiosamente, fue en estos depósitos donde se alcanzaron poblaciones más elevadas de bacterias.

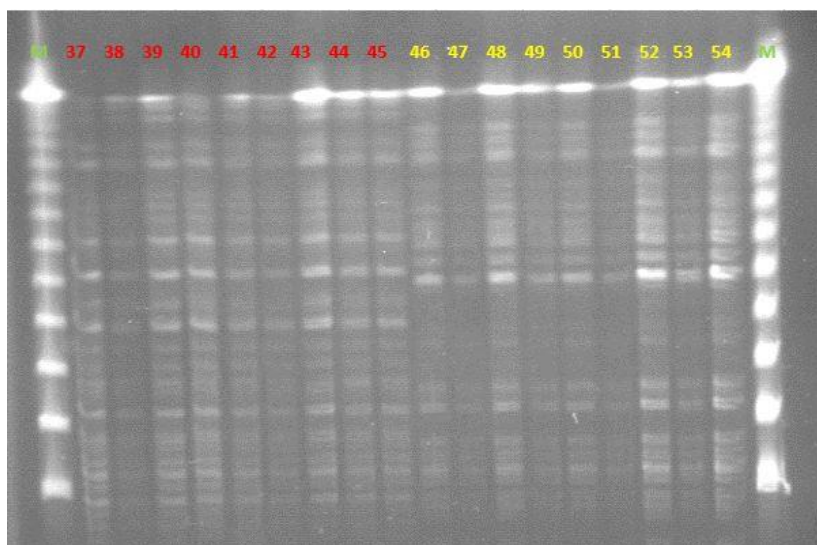
4.2. Control de Implantación

A pesar de las diferencias en la cinética de fermentación entre las cepas, todas ellas se implantaron al 100% en todas las etapas del proceso (Tabla 4). Como se observa en la figura 16, todas las cepas aisladas de los depósitos inoculados con Uvaferm ALPHA muestran un perfil idéntico, y lo mismo ocurre con los procedentes de los depósitos sembrados con la cepa autóctona. Por lo tanto, las diferencias en la cinética de fermentación y en las características finales de los vinos, pueden achacarse a la cepa de BL inoculada que llevó a cabo la fermentación o a las condiciones de producción industrial.

Tabla 4. Porcentaje de implantación de las BL inoculadas en distintas fases (% ácido málico consumido) de la FML.

MH₂ CONSUMIDO (%)	BL1 (%)	BL2 (%)	BL3 (%)
15-20	100	100	100
50-60	100	100	100
>80	100	100	100

Figura 16. Electroforesis de campos pulsados de algunas cepas aisladas en el estudio. Cepas 37-45 en rojo corresponden a aislados de Uvaferm ALPHA, Cepas 46-54 en amarillo corresponden a la bacteria autóctona. M: marcador de peso molecular empleado: CHEF DNA size standard de Bio-Rad.



4.3. Efecto de la fermentación maloláctica en la composición físico-química de los vinos

En la tabla 5 se exponen los datos de los vinos obtenidos tras la FOH que, a su vez corresponden con los datos de partida de todas las experiencias, y los recabados tras la FML. Este proceso se llevó a cabo a una temperatura de 21°C, dentro del rango óptimo (20-25 °C), siendo este parámetro un factor vital para el desarrollo de esta transformación.

Tabla 5. Características físicoquímicas de los vinos antes y después de la FML.

Parámetros	Vino antes FML	Vinos tras FML			
		Testigo	BL1	BL2	BL3
Grado alcohólico	14,20 ± 00	14,20 ± 00	14,20 ± 00	14,20 ± 00	14,20 ± 00
pH	3,97 ± 0,00	4,27 ± 0,03 b	4,17 ± 0,01 a	4,35 ± 0,03 c	4,30 ± 0,00 bc
Acidez Total (g/l sulfúrico)	3,87 ± 0,00	2,70 ± 0,00 a	2,90 ± 0,06 b	2,93 ± 0,06 b	2,90 ± 0,00 b
Acidez Volátil (g/l)	0,29 ± 0,00	0,45 ± 0,02 b	0,33 ± 0,00 a	0,32 ± 0,02 a	0,29 ± 0,00 a
I.P.T.	77,33 ± 0,00	73,03 ± 0,57 a	75,97 ± 0,86 b	74,57 ± 1,19 ab	75,40 ± 0,78 b
I.C.	28,10 ± 0,00	22,48 ± 0,06 a	26,24 ± 0,59 c	25,25 ± 0,13 b	25,44 ± 0,11 bc
Ácido cítrico (g/l)	0,49 ± 0,00	0,10 ± 0,03 ab	0,09 ± 0,04 a	0,18 ± 0,04 bc	0,25 ± 0,03 c

Letras diferentes indican diferencias significativas $p \leq 0.01$.

Comparando los datos iniciales correspondientes al 29 de septiembre con los obtenidos tras la FML se observan cambios en todos los parámetros salvo en el grado alcohólico. Estos cambios además difieren significativamente en función de la estrategia de inoculación.

El primero dato que llama la atención en el vino inicial es el pH tan elevado, ya que el rango óptimo se encuentra entre 3,3 y 3,6. A un pH de 3,97 las bacterias se desarrollan muy rápidamente, siendo una condición óptima para otras especies como *Lactobacillus* y *Pediococcus* que influyen negativamente en la calidad del vino y degradan cantidades importantes de azúcares, glicerina y ácido tartárico, produciendo mayor acidez volátil y otros compuestos como aminas biógenas, carbamato, etc. Al aumentar el pH, el riesgo de una FML descontrolada es mayor (Benito Sáez, 2017).

La variedad Maturana tinta se define en bibliografía como una variedad que proporciona vinos con pH bajo debido a la alta acidez, por lo que valores tan elevados de este parámetro no tienen una explicación.

Por la experiencia de la bodega donde se realizó la experiencia y de su enólogo, durante las diferentes añadas, en esta variedad se obtienen vinos con valores de acidez total buenos (3,2-3,3 g/L en sulfúrico) y pH altos (en torno a 4), lo que lleva a pensar que la variedad Maturana tinta no se comporta de acuerdo a la información obtenida en la bibliografía (punto 1.4), ya que los valores de partida del mosto fueron para la acidez total: 4,1 y de pH: 3,73 (muy altos ya antes de que comenzase el proceso de vinificación). Esta descompensación entre estos parámetros puede deberse al equilibrio de los ácidos en la uva ya que la Maturana tinta no acumula potasio y mantiene más ácido tartárico. Para los técnicos de la bodega este comportamiento en esta variedad es normal. También se deben tener en cuenta las características de la añada 2017 en las que predominó una elevada sequía con la consecuente subida de grado alcohólico general en los vinos, y pérdidas de acidez. Por lo tanto, estos valores de pH podrían ser explicados por un efecto sinérgico entre las características varietales y las condiciones climáticas del año 2017.

Como es lógico, dado que durante la FML se produce una pérdida de hasta el 30% de la acidez total, el pH aumenta normalmente entre 0,1 y 0,2. Comparando los valores de este parámetro entre tratamientos el único cuyo aumento se encuentra dentro de este rango es la Uvaferm ALPHA (BL1) que presenta diferencias significativas con el resto de tratamientos. En el resto de tratamientos el aumento es mayor llegando incluso a suponer un incremento del 0,38 en la BL2. En la fermentación espontánea, el incremento es similar a la BL2 y BL3. Estos datos resultan extraños puesto que al añadir BAL se prevé un mayor control del proceso y, por tanto,

la explicación al incremento tan acentuado puede deberse a el pH tan elevado en las condiciones de partida.

Respecto a la acidez total, dado que es un parámetro relacionado de manera inversamente proporcional con el pH se espera que el valor de partida se encuentre por debajo del rango óptimo. Sin embargo, 3,87 g/L de sulfúrico se encuentra dentro del rango esperado (2,94-3,92 g/L de sulfúrico). El descenso en todos los tratamientos de este parámetro se encuentra dentro de lo esperado (un 30%). Se encontraron diferencias significativas entre el testigo y el resto de tratamientos, siendo más pronunciado el descenso cuando no se han inoculado BAL, probablemente debido a una FML descontrolada. Los valores de los cuatro tratamientos distan mucho del parámetro óptimo para la acidez total situado entre 3,4 y 3,8 g/L se ácido sulfúrico.

La acidez volátil en el vino inicial presenta un valor correcto (0,29 g/L). Normalmente tras la FML los vinos sufren un incremento de este parámetro. Según se indica en la tabla 5, el incremento de la acidez volátil en los tratamientos inoculados entra dentro de lo esperado no presentando diferencias significativas entre ellos, mientras que el testigo sufre un incremento mayor, debido probablemente al metabolismo de las bacterias lácticas que se desarrollaron en los depósitos. Este resultado sugiere que la inoculación con cepas seleccionadas es eficaz para controlar este parámetro durante la FML.

Respecto a los parámetros del color, tras la FML, la disminución de la intensidad de color en los vinos tintos se puede explicar por el aumento de pH que favorece la oxidación de los antocianos, y por una destrucción de los mismos, debida posiblemente a una hidrólisis de la molécula producida por el complejo enzimático de las bacterias lácticas en la búsqueda de la parte azucarada de la misma. La actividad glicosidasa de las bacterias lácticas con efecto antocianásico está suficientemente demostrado, liberando las antocianinas que precipitan con los polisacáridos, produciéndose una reducción de la intensidad de color estimada en un 10-20% (Hidalgo Togores, 2011). El dato de partida de IPT es 77,33, valor cercano al referente en vinos de esta variedad en esta bodega (más de 70 IPT). Tras la FML se produce un ligero descenso significativamente mayor en el testigo que en los inoculados (no con una de las dos versiones de la bacteria SILKA).

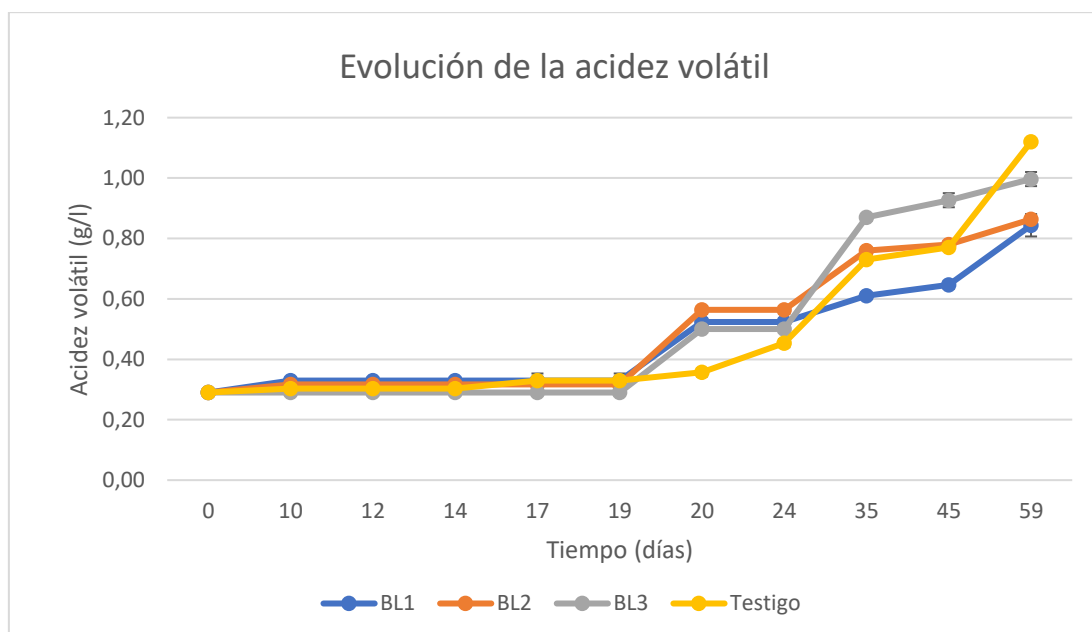
En cuanto al IC la tendencia descendente es parecida al de los IPT excepto que en este caso existen diferencias estadísticamente significativas entre el testigo y todos los tratamientos inoculados, dándose una disminución más acentuada en el testigo.

Como se ha comentado previamente, se llevó a cabo una inoculación cuádruple de la bacteria Uvaferm ALPHA, cuyos datos no se han incluido en la tabla 5 debido a que sólo se hicieron dos repeticiones. El objetivo al añadir esta dosis a los depósitos fue estudiar el efecto de la FML realizada por una mayor población sobre los parámetros del color. El valor de IPT obtenido fue de $76,60 \pm 0,42$ y el de IC fue de $22,57 \pm 0,36$. Comparándolo con los datos de las otras muestras indicados en la tabla 5, una mayor población de microorganismos hizo que se perdiera más color en el proceso ya que el IC fue más bajo. Sin embargo, el IPT presentó un mayor valor. Estos datos indicarían que esta bacteria no tiene mucha capacidad de adsorber antocianos en su pared, ya que cuadruplicar la dosis de la misma no tuvo un efecto importante sobre los parámetros del color.

Por último, el ácido cítrico, fue consumido en mayor o menor medida durante la FML por, las BAL, siendo la Uvaferm ALPHA y las bacterias que condujeron la FML espontánea las que lo consumieron en mayor medida. Por su parte, las bacterias SILKA lo consumieron en menor proporción.

4.4. Evolución de la acidez volátil

Figura 17. Evolución de la acidez volátil entre tratamientos.



Partiendo del mismo valor de acidez volátil: 0,29 g/l en todas las experiencias se observa un ligero incremento durante la FML. El día 19 de ensayo, todos los depósitos inoculados habían

terminado la FML, y el testigo estaba finalizándola. En ese punto el incremento de la acidez volátil varia entre 0 y 0,16 (Tabla 5), y apenas se hace evidente en la Figura 17. Sin embargo, a partir de ese momento, durante el almacenamiento de los vinos, este parámetro aumenta constantemente.

El día 24 de tratamiento corresponde con la finalización de la FML en el tratamiento más tardío que fue el testigo. A partir de ese punto, es evidente que aumentan las pendientes de todos los tratamientos y, por tanto, el aumento de los valores de acidez volátil es más acusado. Por tanto, esta experiencia evidencia que la FML no es la causante del aumento de la acidez volátil, sino que este parámetro sigue aumentando una vez concluida ésta, probablemente debido al desarrollo de otros microorganismos en los vinos ya que las condiciones son favorables, especialmente por los valores tan elevados de pH.

Para evitar el excesivo aumento de acidez volátil en los vinos de Maturana tinta, se le podría sugerir a la bodega que además de inocular los depósitos con bacterias seleccionadas, realice un ajuste de la acidez del vino final antes del almacenamiento, o a lo largo de las distintas etapas de la vinificación.

5. CONCLUSIONES

- La siembra de BAL en vinos de Maturana tinta supone una aceleración y control de la FML.
- Las cepas de *Oenococcus oeni* autóctonas estudiadas muestran diferencias con respecto a la cepa comercial siendo ligeramente menos eficientes en la cinética del proceso. Sin embargo, habría que considerar otras características fisicoquímicas y organolépticas aportadas por estas cepas al vino y que no se han analizado en este trabajo.
- En el presente trabajo la FML no fue la responsable de la elevada acidez volátil que presentaban los vinos de Maturana tinta de esta bodega. La posible causa de esta desviación podría ser una contaminación posterior a la FML.
- Los vinos de Maturana tinta elaborados en esta bodega presentan pHs muy elevados que es necesario controlar para evitar desviaciones.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandre, H. y otros, 2004. *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Food Microbiology*, Issue 93, pp. 141-54.

Bartowsky, E., 2005. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation-moving into molecular arena.. *Austr. J. Grape Wine Res.*, Issue 11, pp. 174-187.

Bauer, R. & Dicks, L., 2004. Control of malolactic fermentation in wine: A review.. *South African Journal for Enology and Viticulture*, Issue 25, pp. 74-88.

Benito Sáez, P., 2017. Urbina vinos. [En línea] Available at: <http://urbinavinos.blogspot.com/2017/04/conduccion-de-la-fermentacion.html> [Último acceso: 19 Junio 2020].

Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L. & Kunkee, R., 1998. *Malolactic fermentation*. En: *Principles and practices of winemaking*. New York: The Chapman and Hall Enology Library.

Carreté, R., Vidal, M., Bordons, A. & Constanti, M., 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol.*, Issue Lett. 211, pp. 155-159.

Consejo Regulador D.O.Ca Rioja, 2019. Riojawine. [En línea] Available at: <https://www.riojawine.com/es-es/el-rioja/variedades-de-uva/maturana-tinta/> [Último acceso: 1 Mayo 2020].

Costello, P., 2005. *The chemistry of malolactic fermentation*. En: *Malolactic fermentation in wine*. Montréal, Canadá: Lallemend, pp. 4: 1-4:11.

Costello, P. & Henschke, P., 2002. Mousy off-flavor of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *J.Agric.Food Chem.*, Issue 50, pp. 7079-7087.

Delteil, D., 2004. *Gestión práctica de la fermentación maloláctica de vinos tintos mediterráneos*. *Semana Vitivinícola*, Issue 3036, pp. 3478-3484.

Delteil, D., 2005. *Personal communication*. In: Loubser, P. *Environmental factors affecting malolactic fermentation*. En: *Malolactic fermentation in wine*. Nontréal, Canadá: Lallemend Inc., pp. 9:1-9:5.

Du Plessis, H. y otros, 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *Food Microbiol.*, Issue 91, pp. 19-29.

Edwards, C. & Jensen, K., 1992. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington State wines: *Pediococcus* spp. *J. Enol. Vitic.*, Issue 43, pp. 233-238.

Figueredo, A. y otros, 2008. Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*, Issue 25, pp. 105-112.

Flanzy, C., 2000. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones ed. Madrid (España): Ediciones Mundi-Prensa.

- García Barceló, J., 1990. *Técnicas Analíticas para vinos*. Barcelona: GAB.
- García-Escudero, E., 2005. Manejo de riego y calidad de la vendimia. VII Jornadas de Actualización en Enología y Viticultura.. Vilafranca de Penedès. pp: 21-27., s.n.
- García-Escudero, E., 2007. Experiencias de riego en la D.O.Ca. Rioja. En: 'Fundamentos, aplicación y consecuencias del riego de la vid'. s.l., Agrícola Española S.A. pp. 201-230.
- García, M., Zúñiga, M. & Uruburu, F., 1992. Revisión: el metabolismo y el control de las bacterias lácticas en vino.. *Rev. Esp. Cien. Tecn. Alim.*, Issue 32, pp. 233-268.
- Garijo, P. y otros, 2008. The occurrence of fungi, yeast and bacteria in the air of a Spain winery during vintage 2006. *Int. J. Food Microbiol.*, Issue 125, pp. 141-145.
- Henick- Kling, T., 1993. Malolactic fermentation. En: H. H. A. Publishers, ed. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Philadelphia, CA: Fleet, G, pp. 289-326.
- Hidalgo Togores, J., 2011. *Tratado de Enología*, Tomo II. 2ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Krieger, S., 2006. Historia de la bacteria maloláctica en el vino. En *Informe Técnico III Encuentro Enológico: 'Fermentación Maloláctica'*. Madrid, Fundación para la cultura del Vino.
- Kyne, A. & Gertsen-Briand, S., 2006. Guía para resolver problemas. En: *Informe Técnico III Encuentro Enológico: 'Fermentación Maloláctica'*. Madrid, 15 de marzo. 47-50., Fundación para la Cultura del Vino.
- Lallemend, 2018. Lallemend Wine. [En línea] Available at: www.lallemendwine.com/es/chile/productos/catalogo/bacterias-es/23/lalvin-silka/ [Último acceso: junio 2020].
- Lallemend, 2018. Lallemend Wine. [En línea] Available at: <https://www.lallemendwine.com/es/spain/productos/catalogo/bacterias-es/3/uvaferm-alpha-mbr/> [Último acceso: junio 2020].
- Lonvaud-Funel, A., 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects.. *FEMS Microbiol.*, Issue Lett. 126, pp. 209-214.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, Issue 76, pp. 317-331.
- Lonvaud-Funel, A., 2001. Interactions between lactic acid bacteria of wines and phenolic compounds . En: *Nutritional aspects II. Sinergy between yeast and bacteria*. . Perugia, Italia: Les entretiens scientifiques Lallemend. 27-30 abril 2001, pp. 27-35.
- Lonvaud-Funel, A., 2006. Bacterias lácticas y fermentación maloláctica. En: *Informe Técnico III Encuentro Enológico: 'Fermentación Maloláctica'*, Madrid: Fundación para la Cultura del Vino.
- López, I., 2004. Detección y control por técnicas de biología molecular de bacterias lácticas autóctonas responsables de la fermentación maloláctica en vinos de D.O.Ca. Rioja, Logroño: Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja..
- López, I. y otros, 2007. Aminas biógenas en vinos de la D.O.Ca. Rioja de la cosecha 2006. Logroño, *Actas XIII Congreso Nacional de Enólogos*.

López, I. y otros, 2008b. Estudio de la biodiversidad de bacterias lácticas presentes en un vino tinto. Verona, Actas 31 Congresso Mondiale della Vigna e del Vino.

López, R., 2009. Control de la Fermentación Maloláctica en vinos tintos de Rioja. Influencia en su calidad higiénica, físico-química y sensorial. Universidad de La Rioja ed. Logroño: Memoria Tesis Doctoral.

Loubser, P., 2004. Familiarise yourself with Malolactic Fermentation.. Winboer Technical Yearbook (a Wineland publication), Volumen 2004/5, pp. 32-33.

Maintz, L. & Novak, N., 2007. Histamine and histamine intolerance. Am J. Clin. Nutr., Issue 85, pp. 1185-96.

Martínez de Toda, F.; Sacha, J.C.; Balda, P. ICVV (Universidad de La Rioja, CSIC, Gobierno de La Rioja), 2013. Acenologia. [En línea] Available at: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/variedades_recuperadas_rioja_cienc0213.htm [Último acceso: 1 Mayo 2020].

Martínez de Toda, F., 2011. Claves de la viticultura de calidad. Nuevas técnicas de estimación y control de la calidad de la uva. 2ª ed. Madrid: Mundiprensa.

Moreno-Arribas, M., 2003. La fermentación maloláctica y su repercusión en la calidad del vino. Tecnología del vino. Noviembre/diciembre, pp. 52-57.

Murat, M.-L., Gindreau, E. & Augustin, C., 2007. MLF management part 1: the principles of malolactic fermentation.. Austr. & N.Z. Grapegrower & Winemaker: May, pp. 56-61.

Palacios, A. y otros, 2004. Percepción del consumidor bien informado de defectos organolépticos del vino provocados por fermentación maloláctica sin control. Vitic. Enol. Profesional, Issue 94, pp. 29-38.

Peynaud, E., 1967. Recent studies on the lactic acid bacteria on wine. En: Deuxième Symp. Int. Oenol.. Bordeaux-Cognac: INRA, París, pp. 13-17.

Polo, L. y otros, 2011. Biogenic amine synthesis in high quality Tempranillo wines. Relationship with lactic acid bacteria and vinification conditions.. Ann Microbiol, Issue 61, pp. 191-198.

Reguant, C., 2001. Identificació molecular de soques d'Oenococcus oeni i efecte de diverses condicions de vinificació sobre la seva dinàmica de poblacions., Tarragona: Tesis doctoral. Universidad Rovira y Virgili..

Renouf, V., Claisse, O. & A., L.-F., 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria.. Austr. J. Grape Wine Res., Issue 11, pp. 316-327.

Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., Walling, E. & Coulon, J., 2006b. Le suivi microbiologique du vin. Partie 1: De la parcelle au conditionnement: un outil pour une oenologie raisonnée.. Révue des Oenologues, Issue 118, pp. 27-31.

Renouf, V., Strehaiano, P. & Lonvaud-Funel, A., 2007. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE.. J.Int.Scy. Vigne Vin., Issue 41, pp. 51-61.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B. & Lonvaud, A., 1998. Traité d'Oenologie. Tome 1. Microbiologie du vin. Vinifications. Paris: Dunod.

Rojo-Bezares, B. y otros, 2007. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology*, Issue 24, pp. 482- 491.

Smit, A., Engelbrecht, L. & duToit, M., 2012. Managing your wine fermentation to reduce the risk of biogenic amine formation. *Front Microbiol.*, Issue 3, pp. 1-10.

Spano, G.; Russo, P.; Lonvaud-Funel, A.; Lucas, P.; Alexandre, H.; Grandvalet, C.; Coton, E.; Coton, M.; Barnavon, L.; Bach, B.; Rattray, F.; Bunte, A.; Magni, C.; Ladero, V.; Alvarez, M.; Fernández, M.; Lopez, P.; de Palencia, P.F.; Corbi, A.; Trip, H.; Lolkema, J.S., 2010. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J Clin. Nutr.*, Issue 64, pp. S95-S100.

Suárez, J. & Íñigo, B., 2004. *Microbiología Enológica. Fundamentos de vinificación*. 3ª ed. Madrid: Mundi-Prensa.

Tosi, E. y otros, 2007. Valutazione d'idoneità qualitativa di un ceppo di *Oenococcus oeni* da impiegare come starter della fermentazione malolattica in vino. *Riv. Vitiv. Enol.*, Issue 1, pp. 35-47.

Van de Kundert, J. & Vliegenthart, J., 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside modifying enzymes. En: *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washintong D.C.: American Society For Microbiology, pp. 547-552.

Versari, A., Parpinello, G. & Cattaneo, M., 1999. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Issue 23, pp. 447- 455.

Vivas, N., Augustin, M. & Lonvaud-Funel, A., 1997. Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Luconostoc oenos* 8413). *J.Sci.Food. Agric.*, Issue 80, pp. 1675-1678.

Wine, L., 2018. <https://www.lallemandwine.com/es/spain/>. [En línea] Available at: www.lallemandwine.com/es/chile/productos/catalogo/bacterias-es/3/uvaferm-alpha-mbr/ [Último acceso: junio 2020].

Zamora, F., 2005. El anhídrido sulfuroso: algunas reflexiones. *Enólogos*, 38(Noviembre-diciembre 2005).

Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P. & Dellaglio, F., 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett. Appl. Micrbiol.*, Issue 27, pp. 243-246.